

氏 名	向 敦 史
生 年 月 日	
本 籍	石 川 県
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 628 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	課程博士 (学位規則第 4 条第 1 項)
学位授与の題目	Lateral gene transfer in <i>Tetrahymena thermophila</i> : Characterization of novel citrate synthase gene (繊毛虫テトラヒメナにおける遺伝子水平伝播：新規クエン酸合成酵素遺伝子の解析)
論文審査委員(主査)	東 浩 (理学部・助教授)
論文審査委員(副査)	櫻井 勝 (理学部・教授) 山口 正晃 (自然科学研究科・助教授) 石田健一郎 (自然科学研究科・講師) 山口 和男 (学際科学実験センター・教授)

学 位 論 文 要 旨

ABSTRACT

Citrate synthase is the initial enzyme in the tricarboxylic acid cycle of mitochondria. In plants and fungi, it is the second isozyme in the glyoxylate cycle of peroxisomes (or glyoxysomes), and it is also present in bacteria. Some of the biochemical reactions in the glyoxylate cycle of ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis* depend upon mitochondrial enzymes, as *T. pyriformis* lacks some glyoxysome-specific enzymes. Here we demonstrate a new citrate synthase gene from *Tetrahymena thermophila* that is different from the mitochondrial counterpart. A potential peroxysome-targeted signal was detected in the N-terminus, suggesting the localization of the enzyme in peroxysomes. Phylogenetic analysis placed the *Tetrahymena* sequence in a clade consisting of a few sequences from eukaryotes such as cellular slime molds and two land plants, near to a green sulfur bacterium and many proteobacteria as a sister group, but not in a mitochondrial clade. Southern blot analysis revealed that this type of gene was absent from distantly related ciliates and other species of *Tetrahymena* except for the closest species *T. mallaccensis*. The scattered presence of the bacterial-like genes among distantly related eukaryotes suggests three alternative interpretations of acquisition of the novel glyoxysomal citrate synthase gene via lateral gene transfer (LGT): 1) Some eukaryotes independently acquired the gene from a common bacterium or closely related bacteria. 2) A

hypothetical eukaryote once acquired the gene, which was thereafter independently transferred from the eukaryote to other eukaryotes. 3) A single event of LGT (or duplication) occurred in a certain common ancestor of eukaryotes, followed by multiple losses in many eukaryotic lineages during the subsequent evolution. Considering the monophyly of the bacterial-like eukaryotic citrate synthase genes, the first model is somewhat unlikely, even though it is not impossible. The second and third models can rationally explain the present observation, so these models will be discussed in some detail.

序論

近年、様々な生物においてゲノム解析が進行中である。これらの組織化された分析により得られる膨大な配列データは、その生物のより正確な系統関係を明らかにするものとして期待されている。しかし、こうして得られた配列データの中には明らかに系統関係と矛盾するものが度々みられる。例えば、真核生物の核ゲノムから得られた配列が原核生物のものと非常に高い相同性を示すことがある。この場合、多くはミトコンドリア等の共生体由来の細胞小器官ゲノムから宿主ゲノムへの DNA の移行として説明がつく (reviewed by Gray 1993)。しかし、真核生物において系統関係を反映せず且つ細胞小器官由来として説明不可能な配列も発見されている。1998 年 Doolittle は "Food Hypothesis" による遺伝子の水平伝播 『Lateral Gene Transfer (LGT)』により、これらの配列の存在を説明した。つまり、食べ物として個体 (細胞) 内に取り込んだ生物の DNA を自らのゲノムに取り込むことがある、ということが提唱された。

ここでは、私は繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* (以下、テトラヒメナ) におけるクエン酸合成酵素 (以下、CS) 遺伝子の水平伝播について報告する。クエン酸合成酵素はミトコンドリアの TCA 回路において、クエン酸を合成する反応を触媒する。植物や菌類では、この CS はペルオキシソーム (グリオキシソーム) にある Glyoxylate 回路でも働いているが、動物にはこの回路は存在しないことが知られている。植物では脂肪種子の発芽に、菌類では炭素源をエタノールや酢酸に制限した時に、この回路が活性化されることが報告されている (Koller and Kindl 1997)。繊毛虫では、1968 年 Muller らによって *Tetrahymena pyriformis* の Glyoxylate 回路が報告されており、その回路は、CSをはじめ複数の酵素が欠けている不完全な回路であることが分っている (図 1)。

今回、私が単離した CS 遺伝子は真核生物のものとは低い相同性しか示さないのに対し、細菌のものとは高い相同性が見られた。このことは、テトラヒメナが細菌の CS 遺伝子を LGT によって得た可能性を示唆している。さら

に、この LGT の起こった時期や経路などについて 3 つの仮説を挙げ考察を行った。

結果

テトラヒメナから得られた新規の CS 遺伝子 (tgCS) の cDNA 配列は全長 1542 bp あり 480 アミノ酸に相当する 1440 bp の ORF を持つことが分かった。この配列を基にした BLAST による相同性検索の結果、数種類の真核生物と多数の細菌の CS 遺伝子が高い相同性を持つものとして該当した。しかし、この中には真核生物のミトコンドリア CS 遺伝子は含まれていなかった。テトラヒメナのミトコンドリア CS は以前に報告があったが(Numata et al 1991)、この配列とも低い相同性しか示さなかった。このことから、テトラヒメナのゲノムには系統の異なる 2 種類の CS が存在することが明かとなった。また、この遺伝子は通常終止コドンとして用いられる TAA や TAG がグルタミンとして使用している箇所や、短いイントロン (52~ bp) の存在など纖毛虫の特徴を備えていた。このことから、この遺伝子はテトラヒメナ由来のものと断定し、さらに解析を進めていった。

この tgCS 遺伝子と他の CS 遺伝子との関係をより詳細に知るために系統樹を 3 種類の方法で作成した (図 2)。その結果、大多数の真核生物の CS は単一の系統となり、これらが同一起源であることが確認された。この中にはミトコンドリアのもの以外にも菌類のペルオキシソームの CS も含まれた。今回の tgCS はこの真核生物のクレードには入らず、小数の真核生物由来の CS とともに、細菌の CS のクレード内に位置した。さらに、 α -proteobacteria や緑色硫黄細菌と単一の系統となった。この tgCS と近系統となった真核生物のものは細胞性粘菌やシロイナズナ、カボチャのものである。先の二つはゲノムプロジェクトで発見され、その機能が未だ明かとなっていないが、カボチャのものは Glyoxylate 回路で働いていることが確認されている。近隣結合法ではこれらの真核生物 CS は緑色硫黄細菌と単系統になる (図 2-A)。しかし、最尤法や最大節約法 (図 2-B) ではこの関係は支持されない。このことから、細菌のクレードに位置する tgCS を含む真核生物の CS は α -proteobacteria や緑色硫黄細菌の遺伝子を水平伝播により得たものだと考えられる。

図 2 の系統樹は N 末端や C 末端、またインサクションやデリッション部分を取り除いた配列で作成したものである。そこで、これらの削除された部位を比較するために作成した模式図を図 3A に示した。tgCS には比較的長い N 末端と C 末端が存在するが、これは、カボチャや緑色硫黄細菌にも共通に見られる。また細菌のクレードに位置した配列はインサクションもデリッションも共通であることがわかった (図 3B)。さらに、tgCS の N 末端には他のペルオ

キシソーム（グリオキシソーム）タンパクと同様のペルオキシソーム移行シグナル（PTS-2）がみつかった（図 3C）。これらのことから、tgCS は細菌の CS 遺伝子を取り込み、ペルオキシソームの Glyoxylate 回路で使用しているものと思われる。実際、tgCS の発現は炭素源の制限された接合時期に多くなることが確認されている。

さらに、この tgCS がいつテトラヒメナに移行してきたのかを検証するために、この細菌様の CS 遺伝子の有無をサザン・ブロットにより他の繊毛虫において調べてみた（図 4）。同じ *Tetrahymena* 属のなかでは *T. thermophila*（テトラヒメナ）に最も近縁である *T. malaccensis* のみにこの遺伝子が存在していることがわかった。他の繊毛虫にはこの遺伝子はみられなかった。このことから、細菌様の CS 遺伝子は *T. thermophila* や *T. malaccensis* が他の *Tetrahymena* 属から分岐した後に獲得したか、もしくは、真核生物の共通祖先の段階で LGT により遺伝子が獲得され、その後、それぞれの系統で遺伝子の欠失が起きたものだと考えられる。

考察

系統解析の結果から、今回の tgCS はミトコンドリア CS とは別系統のものであり、緑色硫黄細菌や α -proteobacteria、小数の真核生物のものと近系統であることが明かとなった。この細菌様 CS はまた、テトラヒメナに最も近縁な *T. malaccensis* を除く他の繊毛虫にはみられなかった。さらに、植物においても、細菌様 CS はシロイナズナでは存在するが稲にはみられない。このような系統関係を反映していない特定の遺伝子の点在は LGT に起因すると考えられる。その LGT の過程としては以下の三通りの解釈が可能である（図 5）。

(A)『同じ、または近縁な細菌が遺伝子の供給源となっている。』という解釈。真核生物の細菌様 CS が単系統になったことから、それぞれ単独に共通の細菌から遺伝子を獲得したと考えられる。(B)『細菌から真核生物への LGT が一度だけ起こり、この真核生物（Putative eukaryote）から他の真核生物に LGT が起こった。』というモデル。この解釈により真核生物のものが単系統になることの説明が容易となる。(C)『真核生物の共通祖先の段階で LGT が起こり、その後、様々な系統で単独に遺伝子の消失が起きた。』可能性。このモデルはペルオキシソーム自体が原核生物の共生体である可能性も示唆している。以上、三つの可能性を挙げたが、どれが正しいのかは未だ判断できない。また、これらとは異なる場合である可能性もある。

現在、テトラヒメナのゲノムプロジェクトによって多くの細菌様遺伝子の存在が報告されており、LGT が頻繁に起こっていることを示唆している。このことから、テトラヒメナの進化には LGT が大きく関わっていると考えら

れる。繊毛虫をはじめとする細菌を補食する単細胞生物では頻繁に LGT が起きられると思われるが、真核生物における LGT の報告は少なく、そのメカニズムも不明な点が多い。そのため、多くの繊毛虫のゲノム情報が LGT のより詳しい知見を得るために必要である。

参考論文

Doolittle WF (1998) You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends Genet* 14:307-311

Flynn CR, Mullen RT and Trelease RN (1998) Mutation analyses of type 2 peroxisomal targeting signal that is capable of directing oligomeric protein import into tobacco BY-2 glyoxysomes. *Plant J.* 16:709-720

Kato A, Hayashi M, Mori H, Nishimura M (1995) Molecular characterization of a glyoxysomal citrate synthase that is synthesized as a precursor of higher molecular mass in pumpkin. *Plant Mol Biol* 27:377-390

Koller W, Kindl H (1977) Glyoxylate cycle enzymes of the glyoxysomal membrane from cucumber cotyledons. *Arch Biochem Biophys* 181:236-248

Muller M, Hogg JF, De Duve C (1968) Distribution of tricarboxylic acid cycle enzymes and glyoxylate cycle enzymes between mitochondria and peroxisomes in *Tetrahymena pyriformis*. *J Biol Chem* 243:5385-5395

Numata O, Takemasa T, Takagi I, Hirano M, Hirano H, Chiba J, Watanabe Y (1991) *Tetrahymena* 14-nm filament-forming protein has citrate synthase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 176:1028-1034

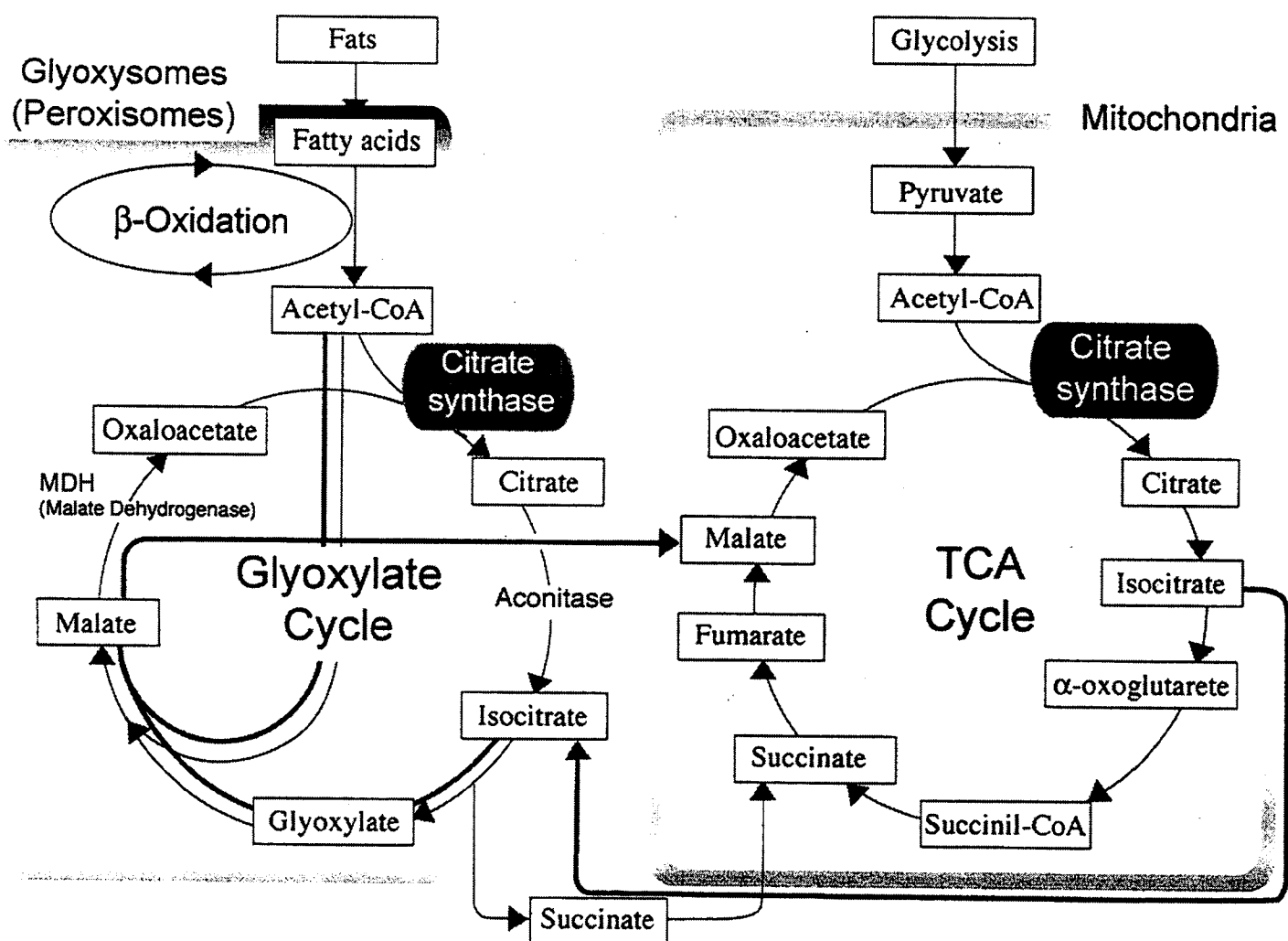


Figure 1. Spatial organization of the TCA cycle and the Glyoxylate cycle. The black arrows indicate the situation in germinating castor bean seedling endosperm. The red arrows indicate the situation in *Tetrahymena pyriformis*. *T. pyriformis* lacks some enzyme (MDH, CS and aconitase) from glyoxylate cycle.

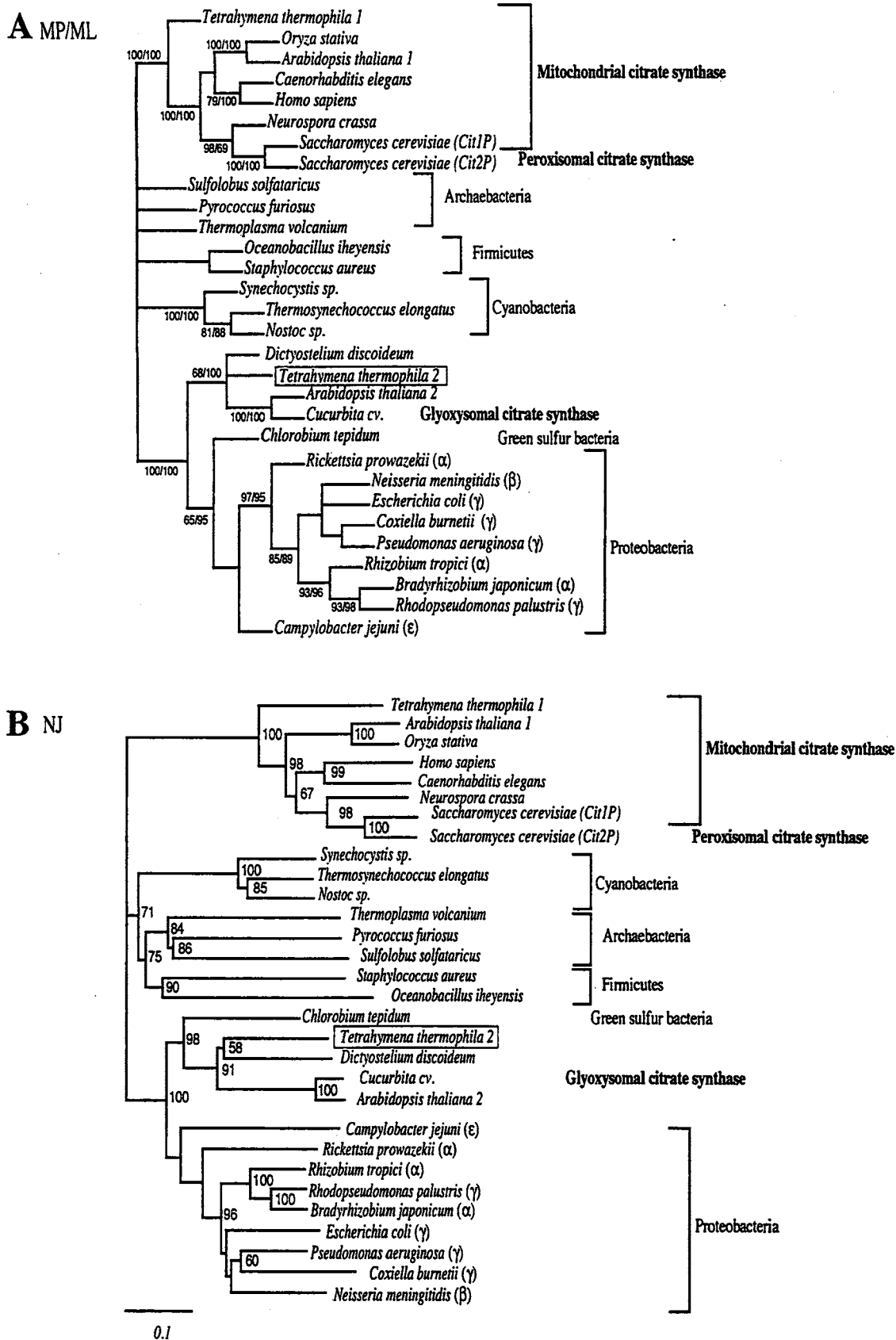
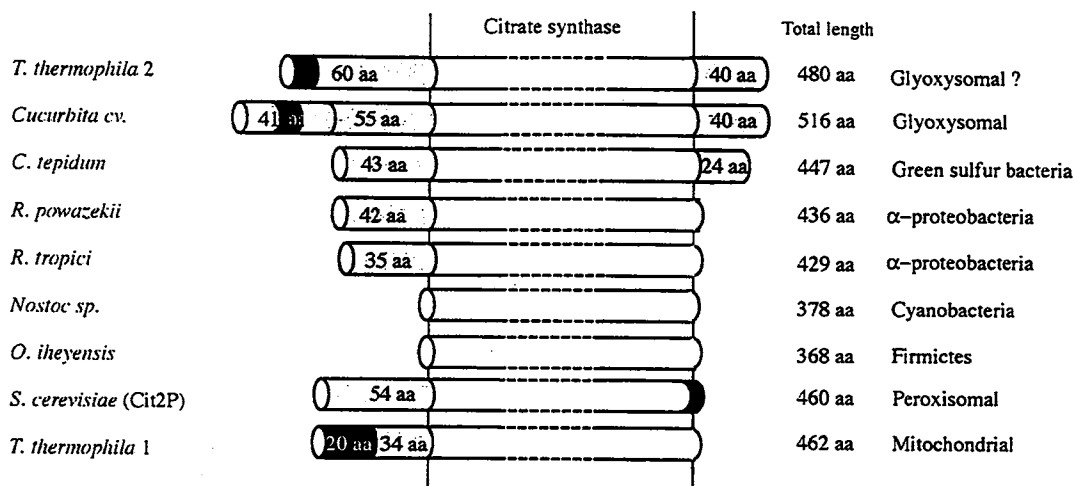


Figure 2. Phylogeny of citrate synthase. (A) A phylogenetic tree constructed by the maximum likelihood (ML) and maximum parsimony (MP) methods. The numbers at nodes correspond to bootstrap support of more than 50 % from maximum parsimony (left) and maximum likelihood (right). Groups of related organisms are named on the right. (B) Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining (NJ) method. In this tree, the monophyly of *Chlorobium* and a few eukaryotes containing *Tetrachylena thermophila* 2 is supported by a high bootstrap value.

A



B

	226			368			423	
<i>T. thermophila</i> 2	NFLYMMDKL	NENKY	SPHPK	ELEK	IA	LEDEFFIKRKLYP	VEYLD	D KENNIVRPRQ
<i>D. discoideum</i>	NFLYMMDKL	SEPDY	KPNPV	ELEK	QA	LEDEYFVSRKLYP	VEHLE	D PETKIYRPRQ
<i>Cucurbita</i> cv.	NFLYMMDSL	GNRSY	KPNPR	ALEK	AA	LSDEYFVKKRKLYP	RESLD	D PDKIIRPQQ
<i>A. thaliana</i> 2	NFLYMMDSM	GNRSY	KPNPR	ALEK	AA	LSDEYFVKKRKLYP	RESLD	D PDTRIMRPPQ
<i>C. tepidum</i>	NFLHMMFAT	PCTKY	KVNPI	ELEA	LA	LKDEYFIERKLYP	KEMHE	D PEQKISRPRQ
<i>R. powazekii</i>	NFLRMCFAY	PCEEY	VVNPV	ELER	IA	LTDDYFIEKKLYP	NEMIE	D PDQRIGRPRQ
<i>R. tropici</i>	NFLSMMFRM	TEKNY	KPNPV	ELER	IA	LEDDYFIQRKLYP	IEHVK	D PEQKIARPRQ
<i>Nostoc</i> sp.	NFLYMLNEK	-----	EPDAL	EMER	--	VVEEKLGHKGIYP	KEQLE	- -ENRIFRPTQ
<i>O. iheyensis</i>	NFLYMITGK	-----	EPSDL	EVMK	--	-----KEKGLYP	VEQHS	- -NNRIFRPRV
<i>S. cerevisiae</i> (Cit2P)	NYAHMMGFE	-----	--QHV	DVIP	-K	KLLTYKKIANPYP	IWSRA	- FGLPIERPGRS
<i>T. thermophila</i> 1	NLVNLIGSK	-----	--DED	EVAP	-G	VLTEHGKTKNPWP	ITDRA	- IGASIERPKS

C

<i>T. thermophila</i> 2	-----ME	RITDLNQQI	ITNETGEKEYTVDNRNGKTYE	34
<i>Cucurbita</i> cv. (PGCS)	MPIDMELSPSNVARH	RLAVLAAHL	SAASLEPPVMASLEAHCVSAQT	47
<i>S. cerevisiae</i> (thiolase)	-----MSQ	RLQSIKDHL	VESAMG-KGESKRKNSLLEKRPE	35
watermelon (GMDH)	-----MQPIPDVNQ	RIARISAHL	HPPKSQMEESSALRRANCRAGG	41

**		**
RL		HL
/	X5	/
KV		QA
/		/
I		

Peroxisome targeting signal (PTS-2)

Figure 3. Characteristics of citrate synthases from representative organisms. (A) Comparison of partial amino acid sequences of *T. thermophila* 2 bacterial-type citrate synthase with other representative sequences. Three insertions shared by *T. thermophila* 2, *Dictyostelium*, *Cucurbita*, *Arabidopsis* 2, *Chlorobium*, and two proteobacteria are boxed. The numbers correspond to the amino acid residues of the *T. thermophila* 2 gene. (B) A diagram of the differences in the N- and C-termini. The central part of the citrate synthase sequence is omitted. Black parts correspond to a peroxisomal targeting signal (PTS) in *Cucurbita* at N terminus (PTS-2) and Cit2P at C terminus (PTS-1), and a mitochondrial targeting signal in *T. thermophila*. Gray parts denote termini that are particularly longer than those of most bacteria except proteobacteria and green sulfur bacteria. (C) Comparison of amino-terminal regions of peroxisomal (glyoxysomal) proteins. *T. thermophila* 2, putative glyoxylate citrate synthase; *Cucurbita* cv. (PGCS), pumpkin glyoxysomal citrate synthase (Kato et al., 1995); *S. cerevisiae* (thiolase), peroxisomal thiolase (Einerhand et al., 1991); watermelon (GMDH), watermelon glyoxysomal malate dehydrogenase (Gietl, 1990). The consensus sequence of peroxisomal targeting signal (-R/K-L/V/I-X5-H/Q-L/A-) (Flynn et al., 1998) is shown in a box.

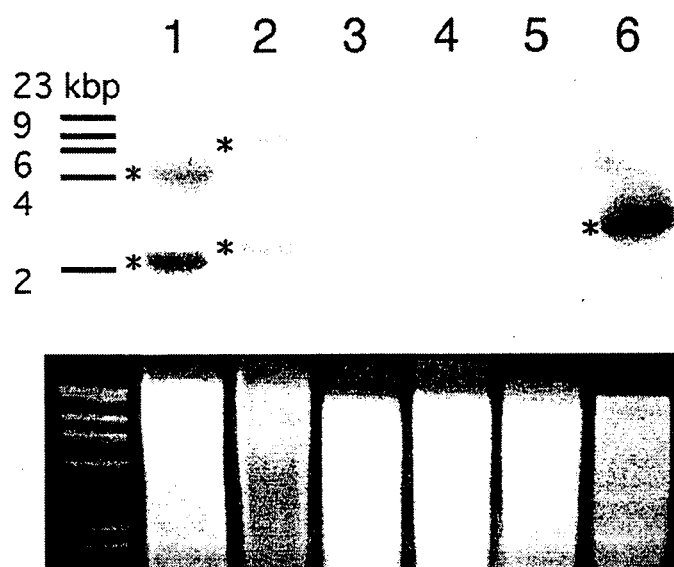


Figure 4. Southern blot analysis to detect the bacterially-derived citrate synthase gene among ciliates. DNAs are as follows: lane 1, *Tetrahymena thermophila* (Strain CU813); lane 2, *T. malaccensis*; lane 3, *T. tropicalis*; lane 4, *T. pyriformis*; lane 5, *P. caudatum*; lane 6, *Dictyostelium discoideum*. Detectable signals are indicated by an asterisk. A fragment (643 bp) of the *T. thermophila* gene labeled with α -[^{32}P]dTTP was used as a probe. Although hybridization was carried out under low stringent condition (40°C against 65°C in stringent condition), no positive signals were detected in any ciliate DNAs other than *T. thermophila* and *T. malaccensis* DNA.

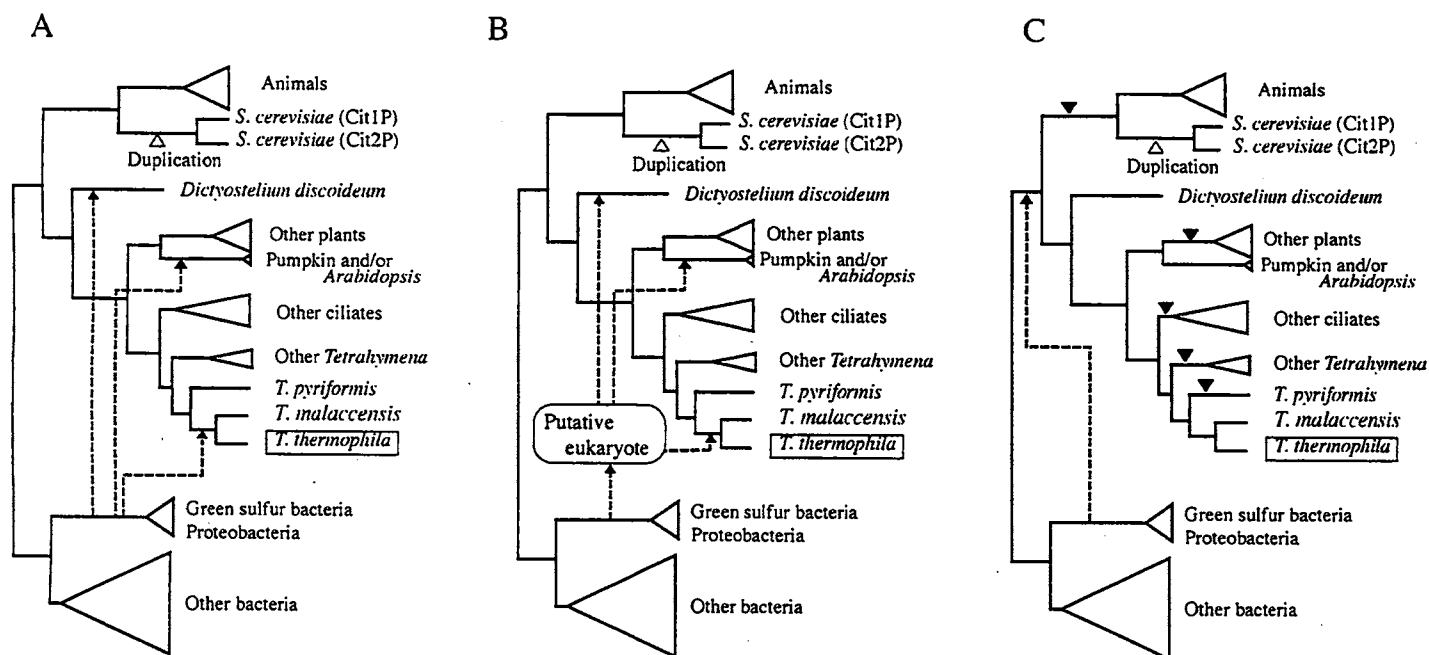


Figure 5. A schematic representation of three alternative explanations for evolutionary history of citrate synthase genes. Dashed arrows indicate the lateral transfer of the citrate synthase gene. White arrow head indicates a duplication of the mitochondria-targeted gene in yeast. Black arrow heads show gene loss in various eukaryotic lineages. Given the great distance of the phylogenetic relationships between these eukaryotes, it can be postulated that these lateral transfers took place independently. (A) A model of independent LGTs. The citrate synthase gene was transferred repeatedly from a common bacterium or closely related bacteria belonging to either green sulfur bacteria or proteobacteria to each eukaryote. (B) An alternative model of independent LGTs via a hypothetical eukaryote. The citrate synthase gene was once transferred from a bacterium to a putative eukaryote. Later, the gene in the eukaryote was directly incorporated into the genomes of other eukaryotes such as *Tetrahymena*, *Dictyostelium* and land plants via the secondary LGT. (C) A model of multiple losses. An ancestor of eukaryotes once obtained the citrate synthase gene via LGT or gene duplication, thereafter most species lost the gene separately in each lineage.

学位論文審査結果の要旨

ミトコンドリアや葉緑体の祖先は、ある種のバクテリアに由来するという共生進化説はほぼ確実に受け入れられている。細胞内共生が共生体の DNA を宿主の核ゲノムへと容易に移行させるという知見も増加しつつある。Doolittle (1998) による Food hypothesis 説の提唱以来、食物として取り込まれた生物由来の DNA が捕食者である系統的に離れた生物のゲノムに転移した（遺伝子の水平転移：Lateral Gene Transfer）可能性を示唆するデータが得られつつある。本研究は、自由生活する従属栄養生物である原生動物・繊毛虫テトラヒメナのゲノム内にバクテリア起源の遺伝子が存在することを示す初めての例である。クエン酸合成酵素は、通常ミトコンドリアの TCA 回路を構成する酵素である。テトラヒメナにおいて、今回新たなクエン酸合成酵素遺伝子が単離され、分子系統解析によりこの遺伝子は緑色硫黄細胞もしくはプロテロバクテリア起源であることが明らかになった。N 末端側にペルオキシソーム移行シグナルがあることから、この新しい遺伝子はグリオキシソーム内で機能すること、この遺伝子の獲得によりミトコンドリアに依存したグリオキシレート回路が完全に独立し、飢餓状態に対する耐性を獲得した可能性が示された。

一般に、ゲノム内での遺伝子の重複は進化の過程において新しい機能を創造することが知られている。本研究は、同様に遺伝子の水平転移によって捕食者のゲノム内に取り込まれた外来性の遺伝子が、捕食者に新しい機能を付与することにより、進化を促進する可能性があること、すなわち遺伝子の水平転移は重要な進化の駆動力であることを示した点で、進化生物学においてきわめて重要である。したがって、本論文は博士（理学）に値するものと判定した。